



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 33 929.5

Anmeldetag:

25. Juli 2002

Anmelder/Inhaber:

Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universi-
tät zu Berlin, Berlin/DE

Erstanmelder:

Prof. Dr. Karl S t a n g l , Berlin/DE

Bezeichnung:

Verwendung eines Proteasom-Inhibitors zur Behand-
lung fibrotischer Erkrankungen

IPC:

A 61 K 38/55

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Klosternmeyer

Prof. Dr. Karl Stangl

25. Juli 2002
C37141 BÖ

**Verwendung eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung
fibrotischer Erkrankungen**

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

10 Die Myokardfibrose ist eine Antwort auf die Überlastung des Herzmuskels, welche beispielsweise durch Bluthochdruck, Herzinfarkt oder Kardiomyopathien verursacht wird. Zu diesem Phänomen tragen zahlreiche pathophysiologische Mechanismen bei, wie etwa die Proliferation von Herzbindegewebszellen, die zu einer erhöhten Matrixbildung führen. Funktionelle Endzustände sind die Massenzunahme des Herzmuskels und ein verstärkter bindegewebiger Umbau (Fibrose).
15 Ein Kennzeichen des Umbaus am Herzen ist somit die interstitielle Fibrose, welche zu einer erhöhten Steifheit der Herzwände führt. Dies mündet funktionell in eine diastolische Dysfunktion, die die Herzmuskelschwäche weiter verschlimmern kann. Teilweise werden diese Effekte durch eine verstärkte Expression von Genen verursacht, die für extrazelluläre Matrixproteine, wie Collagen I und III, die dominanten Collagene des Herzmuskels, kodieren.
20

Die zur Zeit am besten etablierte Strategie zur Verringerung der Herzfibrose besteht in der pharmakologischen Inhibierung des Renin-Angiotensin-Systems, beispielsweise durch ACE-Inhibitoren oder Angiotensin II-Blocker. Diese Substanzen haben jedoch den Nachteil, dass sie in wenigstens 5% der Fälle zu Unverträglichkeiten bei den Patienten führen. Weiterhin wirken sie nur auf die durch das
25 Renin-Angiotensin-System vermittelte Herzfibrose und nicht auf die durch andere Agonisten wie etwa durch TGF-beta (transforming growth factor beta) oder Endothelin-1 vermittelte Entwicklung einer myokardialen Fibrose. Es besteht daher

der Bedarf an alternativen Methoden, die eine Herzfibrose verringern oder vermeiden können.

5 Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Inhibierung des Proteasomsystems effektiv eine Herzfibrose verringern bzw. vermeiden kann, was zu einer verbesserten Herzfunktion führt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen. Die fibrotischen Erkrankungen können unterschiedlichste Organsysteme, wie Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen. Insbesondere bezieht sie sich auf fibrotische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.

15 Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der Hauptstoffwechselweg für den Abbau von intrazellulären Proteinen in eukaryontischen Zellen, wie z.B. von Signalmediatoren, Zellzyklusproteinen und Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Proteasoms die zelluläre Proliferation blockiert, mit verschiedenen Signalwegen interferiert und die Genexpression beeinflusst (Lee, D. H. et al. (1998) Trends Cell Biol., 8397-403; Yu C.-L. et al. (1997) J. Biol. Chem., 272, 14017-14020; Heldin C.-H. et al. (1999) Nat. Cell Biol., 1, E195-E197 und Desterro, J. M. P. et al., (2000) Cell Mol Live Sci., 57, 1207-1219).

25 Als Proteasom-Inhibitoren sind zum einen niedermolekulare organische Verbindungen und zum anderen molekularbiologische Verbindungen geeignet, die vorzugsweise im wesentlichen spezifisch das Proteasom inhibieren. Der Inhibitionstest kann beispielsweise wie bei Dahlmann B. et al. (2000) J. Mol. Biol., 303, 643-653 beschrieben durchgeführt werden. Der Begriff "im wesentlichen spezifisch" gemäß der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass der Inhibitor das Proteasom stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen, wie z. B. Calpain, 30 Cathepsine oder TPPII, vorzugsweise ca. 10mal stärker, insbesondere ca. 100mal stärker, vor allem ca. 1000mal stärker inhibiert als andere intrazelluläre Proteasen.

Die Inhibitionswerte werden üblicherweise als IC_{50} (Konzentration des Inhibitors bei 50%iger Inhibition) angegeben und miteinander verglichen. Als niedermolekulare organische Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man organische Verbindungen mit einer relativen Molmasse von kleiner gleich 1000, vorzugsweise kleiner gleich 800. Als molekularbiologische Verbindungen versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, insbesondere RNA oder DNA, die die Expression einer Komponente des proteasomalen Systems inhibieren, beispielsweise die Transkription oder Translation der Proteasomkodierenden Nukleinsäuren, oder Proteine, insbesondere Bindepeptide oder -proteine, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder gegen das Proteasom. Beispielsweise ist die Nukleinsäure eine anti-sense-RNA oder eine Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, ein Triplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz. Als Bindeproteine oder -peptide eignen sich beispielsweise Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile, z. B. einzelkettige Antikörper (scAb) oder Fab-Fragmente, oder Derivate davon, z.B. bispezifische Antikörper, gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems. Eine Beschreibung des proteasomalen Systems und geeigneter Proteasom-Inhibitoren findet sich beispielsweise in Kisselev A. F. & Goldberg A. L. (2001) Chemistry & Biology, 8, 739-758.

Demzufolge eignen sich als Proteasom-Inhibitoren insbesondere Threoninprotease-Inhibitoren, Serinprotease-Inhibitoren und/oder Cysteinprotease-Inhibitoren, vor allem ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd und/oder ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, welches z.B. aus grünem Tee gewonnen werden kann. Vor allem eignet sich der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthyla-

lanin-Leu-boronat (MG273), NIP-Leu₃-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu₃-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx₃-Leu₃-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx₃-Leu₃-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN),
5 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-)Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin) und/oder Cyclosporin, die alle näher in Kisselev A. F. & Goldberg A. L. (2001, supra) und in Fig. 3 näher beschrieben sind, und worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS
10 eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet. Besonders bevorzugt von allen Verbindungsklassen sind Threoninproteaseinhibitoren und davon insbesondere die Verbindungen MG132, MG262, Lactacystin und/oder Epoxomicin, vor allem MG132 und/oder MG262.

15 Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden die Auswirkungen der Proteasom-Inhibierung auf die Herzfibrose in spontan hypertensiven Ratten (SH-Ratten) studiert. Überraschenderweise wurde bei einer Langzeitbehandlung über 12 Wochen mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 bei einer täglichen Dosis von 1
20 mg pro kg eine deutliche Inhibierung der Herzfibrose von ca. 40% festgestellt, wobei der Inhibitor sehr gut vertragen wurde. Die beschriebenen Effekte resultierten in einer verbesserten ventrikulären Funktion in den mit MG132-behandelten Tieren. In vitro wurde eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Wachstums kardialer Fibroblasten und eine spezifische, konzentrationsabhängige
25 Herabregulierung von Collagen I α 2 zu ca. 75% und von Collagen III α 1 von ca. 90% beobachtet. Obwohl bei einer systemischen Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren als Inhibitoren eines zentralen zellulären Systems Zytotoxizität zu erwarten gewesen wäre, wurden bei der beschriebenen Langzeitbehandlung keine messbaren Nebenwirkungen festgestellt, sondern im Gegenteil eine gute Verträglichkeit konstatiert. Somit eignen sich Proteasom-Inhibitoren in bevorzugter Wei-
30

se zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf die Behandlung von Patienten mit einer fibrotischen Erkrankung, vorzugsweise einer Fibrose des kardiovaskulären Systems. Dabei ist sowohl eine systemische wie lokale Applikationsform möglich.

Die folgenden Methoden und Ergebnisse mit den Figuren 1 bis 3 sollen die Erfindung beispielhaft näher beschreiben, ohne sie darauf zu beschränken.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1 beschreibt die Auswirkungen einer MG132 Behandlung von SH-Ratten auf die Herzfibrose bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rotgefärbten links-ventrikulären mikroskopischen Schnitten (Fig. 1A-1C) und auf die Herzfunktion (Fig. 1D-1F).

Figur 1A zeigt einen repräsentativen Schnitt durch das Herz einer unbehandelten Kontroll-SH-Ratte, die eine gesteigerte myokardiale Fibrose zeigt. Das fibrotische Gewebe ist mit Sternchen beispielhaft markiert. Der Balken entspricht 20 µm.

Figur 1B zeigt einen typischen Schnitt durch das Herz eines MG132 behandelten Tieres, welches eine deutlich verringerte Herzfibrose unter Inhibition des Proteasoms zeigt.

Figur 1C zeigt die quantitative Auswertung mittels computerunterstützter Bildanalyse. Dabei ergibt sich eine um ca. 40% verringerte Herzfibrose unter MG132-Behandlung. Mittelwert \pm S.E.M. (standard error of mean = Standardabweichung/Wurzel aus n), n=7-10; *:p<0.05.

Figur 1D zeigt die enddiastolischen Drücke (LVEDP) im linken Ventrikel der Ratten mit deutlich verringertem Druckniveau bei den MG132-behandelten Tieren. Mittelwert \pm S.E.M., $n=6-10$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

5

Figur 1E zeigt die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), die bei den MG132-behandelten Tieren deutlich höher ist. Mittelwert \pm S.E.M., $n=6-10$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

10 **Figur 1F** zeigt die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}), die unter MG132 Behandlung um Faktor 2 höher ist. Mittelwert \pm S.E.M., $n=6-10$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

15 **Figur 2** zeigt die Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf die Proliferation und Collagenexpression in primären Herzfibroblasten der Ratte.

Figur 2A zeigt die dosisabhängige Inhibierung der Proliferation durch MG132. Die Zellen wurden mit 0,1 μ M und 1 μ M MG132 oder 0,1% DMSO stimuliert und täglich gezählt. Mittelwert \pm S.E.M., $n=3$.

20

Figur 2B zeigt die Quantifizierung der mRNA-Menge der Collagene $I\alpha 1$, $I\alpha 2$ und $III\alpha 1$ mittels „real-time“ PCR-Analyse. Unter MG132-Behandlung kommt es dosisabhängig zu einer drastischen Senkung der Expression von Collagen $I\alpha 2$ und $III\alpha 1$. Mittelwert \pm S.E.M., $n=2$.

25

Figuren 3A und B zeigen die chemische Struktur verschiedener Proteasom-Inhibitoren.

30

Methoden

Methode 1: Gewinnung von Herzfibroblasten

Herzfibroblasten wurden aus neonatalen Wistar-Ratten durch Plattieren der Nicht-Myozyten Fraktion von neonatalen Herzen präpariert. Die Herzen wurden 2-3
5 Tage alten neonatalen Ratten entnommen. Ventrikuläres Gewebe wurde mit 50 mg pro ml Trypsin in Hanks-Balanced Salt Saline (HBSS) (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht bei 4°C und mit Kollagenase (0,5 mg pro ml) in Leibowitzmedium (L-15, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutsch-
10 land) für 45 Minuten bei 37°C behandelt. Nach dem Waschen wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C vorplattiert. Die adhärenen Zellen waren hauptsächlich Herzfibroblasten, die unter Standardbedingungen in Standard-M199-Medium mit 10% Neugeborenenkalbserum, L-Glutamin und Penizillin-Streptomycin (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) weiterkultiviert wurden. In den Experimenten
15 wurden subkultivierte Fibroblasten der Passagen 3-7 verwendet.

Methode 2: Proliferationstest

MG132, ALLM und MG262 wurden von Calbiochem® (San Diego, Californien, USA) gekauft und als 10 mM DMSO-Stammlösungen bereitgestellt.
20 Herzfibroblasten (5×10^4 Zellen pro ml) wurden auf 24 Lochplatten ausgesät. Adherente Zellen wurden entweder mit MG132 (0,1 und 1 μM) oder DMSO (0,1%) in Medium mit 10% Serum stimuliert und weiter für 7 Tage kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Proliferation wurde dadurch be-
25 stimmt, dass täglich die lebenden Zellen in dreifacher Ausfertigung mittels Trypan-Blau-Ausschlußmethode gezählt wurden. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen: Der Farbstoff Trypanblau, mit dem die Zellen versetzt werden, kann nur in Zellen mit einer defekten Zellmembran eindringen, die sich daraufhin blau färben. Lebende Zellen mit einer intakten
30 Zellmembran werden nicht angefärbt.

Methode 3: Histologische Bestimmung der Fibrose

Für die pathohistologische Evaluierung wurden die Rattenherzen in Paraffin eingebettet, in 3 µm dicke Schnitte zerteilt, einer Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Rot-Färbung unterworfen und wie in Hoher, B. et al., (1999), Hypertension, 3, 816-822 beschrieben, analysiert. Das Ausmaß der Herzfibrose wurde durch quantitative Morphometrie der Sirius-Rot-gefärbten Schnitte mit einem Bildanalysesystem (Quantimed 500, Image 1.61 Programm) evaluiert. Hierbei wurde das Verhältnis von rot gefärbtem Gewebe (Bindegewebe) gegen das Gesamtgewebe des Schnittes bestimmt.

Methode 4: RNA und RT-PCR-Analyse

Gesamt-RNA wurde mittels Trizolreagenz (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Anschließend wurde die RNA revers transkribiert (AMF Reverse Transkriptase, Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) und mit DNase behandelt (Ambion, Huntingdon, UK). Es wurden PCR-Primer für das Rattencollagen Iα1, Iα2 und IIIα1 und das „housekeeping“ Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) mit der Primerexpresssoftwareversion 1.2 (PerkinElmer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) entworfen und von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland gekauft. Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit SybrGreen in einem ABI PRISM 5700 Sequenzdetektor (PerkinElmer/Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) durchgeführt. Die relative Quantifizierung wurde mittels der vergleichenden C_T-Methode, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt.

25

Methode 5: Tierstudien

Altersgleiche männliche SH-Ratten wurden vom Jackson Laboratory, Maine, USA erhalten. Die Tiere wurden gemäß den internationalen Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren gehalten. 6 Wochen alte Ratten wurden mit MG132 (1 mg pro kg Körpergewicht), 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder physiologischer Kochsalzlösung (n=10 pro Gruppe, tägliche intraperi-

30

toneale Injektionen) für 12 Wochen behandelt. Die Tiere wurden mit einer Hochsalzdiät gefüttert (Trinkwasser mit 2% Natriumchlorid). Der Blutdruck wurde wöchentlich mit Hilfe der Standard-Schwanzmanschetten-Methode gemessen. Die Blutwerte und Standardlabormarker der renalen und hepatischen Funktionen wurden 6 Wochen nach der Behandlung und am Ende der Studie durch Standardmethoden bestimmt. Am Ende der Studie wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion einer 20%igen Urethanlösung (0,9 g pro kg Körpergewicht) anästhesiert und die links-ventrikulären Druckparameter wie bei Saragoca, M. et al. (1981) Hypertension, 3, 380-385 beschrieben, bestimmt. Die Organe wurden entfernt, gewogen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Paraffin für die histologische Analyse eingebettet. Da keine Differenz zwischen DMSO und salzbehandelten SH-Ratten bezüglich der oben genannten Parameter beobachtet wurde, dienten die DMSO behandelten Tiere als Kontrolle für die MG132-Behandlung.

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. bestimmt, sofern nichts anderes vermerkt wurde. Die Signifikanz der Differenz in den links-ventrikulären Druckparametern und in der Quantifizierung der Herzfibrose wurden nach dem Student's T-Test bestimmt. Für den Zellproliferationstest wurde die Signifikanz durch Vergleich der Regressionskoeffizienten von MG132 gegen die Kontrollgruppe gemessen. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Für alle statistischen Kalkulationen wurde die SPSS 9.0 Software benutzt.

Ergebnisse

Die Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 über 12 Wochen wurde im Allgemeinen über diesen langen Zeitraum gut vertragen. In nach 6 Wochen und am Ende der Studie genommenen Blutproben wurden keine Veränderungen im Differentialblutbild oder eine Veränderung der Labormarker, die Nebenwirkungen der Niere oder Leber zeigen, beobachtet. Darüber hinaus zeigten die MG132-behandelten Tiere keine signifikante Änderung im systolischen Blutdruck und im Herzgewicht (Tabelle 1).

Tabelle 1

	Kontrolle	1 mg/kg MG132
Systolischer BD (mm Hg)	196,75±9,1	191,43±11,2
Körpergewicht (g)	286±36.6	280±15.3
Herzgewicht (g)	1.28±0.07	1.18±0.07
HG/KG(mg/g)	4.64±0.61	4.1±0.34

BD steht für Blutdruck; KG für Körpergewicht und HG für Herzgewicht

Wie aus den Figuren 1A bis 1C ersichtlich ist, zeigten MG132 behandelte SH-Ratten eine deutliche Reduktion (-38%) der Herzfibrose verglichen mit den Kontrolltieren bestimmt durch quantitative Morphometrie von Sirius-Rot gefärbten Sektionen der linken Ventrikel.

Die Prävention der Herzfibrose in MG132-behandelten SH-Ratten korrelierte gut mit der normalen links-ventrikulären Funktion, wobei die Kontrollen Anzeichen einer beginnenden links-ventrikulären Dysfunktion zeigten, wie in den Figuren 1D-1F dargestellt: Die Füllungsdrücke (LVEDP) waren deutlich niedriger, (Fig. 1D: 15±2 versus 5±3 mm Hg, $p=0,017$), die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit dp/dt_{max} (Fig. 1E: 8010±538 versus 3375±662 mm Hg, $p=0,003$) und die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit dp/dt_{min} (Fig. 1F: -5046±726 versus -2290±422 mm Hg/s, $p=0,015$) - die Parameter der Herzinotropie und Herzlusitropie sind - waren mehr als doppelt so hoch in den MG132-behandelten SH-Ratten verglichen zu den Kontroll-SH-Ratten.

Um mögliche Mechanismen aufzuklären, wie die Proteasom-Inhibierung zu der verringerten Herzfibrose *in vivo* beitragen kann, wurden primäre Herzfibroblasten der Ratte mit Proteasom-Inhibitoren behandelt. Wie in Figur 2A dargestellt, ver-

ursachte die Behandlung von Herzfibroblasten mit 0,1 und 1 μ M MG132 eine Dosis-abhängige Inhibierung der Proliferation. Darüber hinaus wurde die RNA-Expression von Collagen I α 2 und III α 1 in dosisabhängiger Weise durch MG132 bis zu -73 % und bis zu 91% inhibiert (Figur 2B). Im Gegensatz dazu war die
5 Collagen I α 1 Expression unbeeinflusst. Ein zweiter spezifischer Proteasom-Inhibitor MG262, welcher ein Boronatderivat von MG132 ist, inhibierte die Collagenexpression ähnlich effektiv (Figur 2B) und belegt somit die Spezifität der proteasomalen Inhibition. Der Cathepsininhibitor ALLM, der als Peptid-Aldehyd (A-LLM-al) zwar strukturell mit MG132 verwandt ist, jedoch nur unspezifisch
10 wirkt, zeigte demgegenüber keine Effekte auf die Proliferation (Figur 2B).

Prof. Dr. Karl Stangl

25. Juli 2002
C37141

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die fibrotischen
Erkrankungen fibrotische Erkrankungen von Organen, vorzugsweise von
10 Lunge, Leber, Haut, Gelenke, Skelett und/oder Drüsen betreffen, insbesondere
Erkrankungen des kardiovaskulären Systems.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor eine niedermolekulare organische Verbindung oder eine
15 molekularbiologische Verbindung ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Threoninprotease-Inhibitor, ein Serinprotease-Inhibitor, ein Cysteinprotease-Inhibitor, ein Genexpressionsinhibitor des proteasomalen Systems und/oder ein Bindeprotein oder -peptid gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems, vorzugsweise gegen Ubiquitin und/oder
20 gegen das Proteasom, ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteasom-Inhibitor ein Peptid-Aldehyd, ein Peptid-Boronat, ein Peptid-Vinylsulfon, ein Peptid-Epoxyketon, ein Lactacystin, ein Peptid-alpha-Ketoaldehyd, ein alpha-Ketoamid, ein Indanonpeptid, ein Polyalkylenaldehyd, ein Polyphenol, insbesondere ein Cathechin-3-gallat, eine Nukleinsäure
25 gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems und/oder ein

Antikörper oder ihre bindeaktiven Teile oder Derivate davon gegen mindestens eine Komponente des proteasomalen Systems ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3-5, dadurch gekennzeichnet, dass
- 5 der Proteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al (PSI), CEP1612, Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronat (PS-341), Dansyl-Phe-Leu-boronat (DFLB), Morpholinonaphthylalanin-Leu-boronat (MG273), NIP-Leu₃-vinylsulfon (NLVS), Tyr-Leu₃-VS, NIP-Leu-Leu-Asn-VS, Ada-Tyr-Ahx₃-Leu₃-VS, Ada-Lys(Bio)-Ahx₃-Leu₃-VS Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-
- 10 EX (Epoxomicin), Dihydroeponemycin, Lactacystin, clasto-Lactacystin-beta-lacton (Omuralid), PS-519, Ac-Leu-Leu-Nle-al (ALLN), 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI), 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefablock SC), TMC-95A, Gliotoxin, (-)Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Ritonavir, Lovastatin, Aclacinomicin A (Aclarubicin), Cyclosporin, anti-
- 15 sense-RNA oder Doppelstrang-RNA (dsRNA) gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz, Triplex-bildendes Oligonukleotid gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz und/oder ein Knock-out-Konstrukt gegen eine Proteasom-kodierende Sequenz ist, worin Z eine Benzyloxycarbonylgruppe, al eine Aldehydgruppe, VS eine Vinylsulfongruppe, NIP eine 3-Nitro-4-
- 20 hydroxy-5-iodophenylacetat-Gruppe und Bio eine Biotingruppe bedeutet.

Prof. Dr. Karl Stangl

25. Juli 2002
C37141

Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung mindestens eines Proteasom-Inhibitors vorzugsweise in Form eines Threoninproteaseinhibitors zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen insbesondere des kardiovaskulären Systems.

Fig. 1

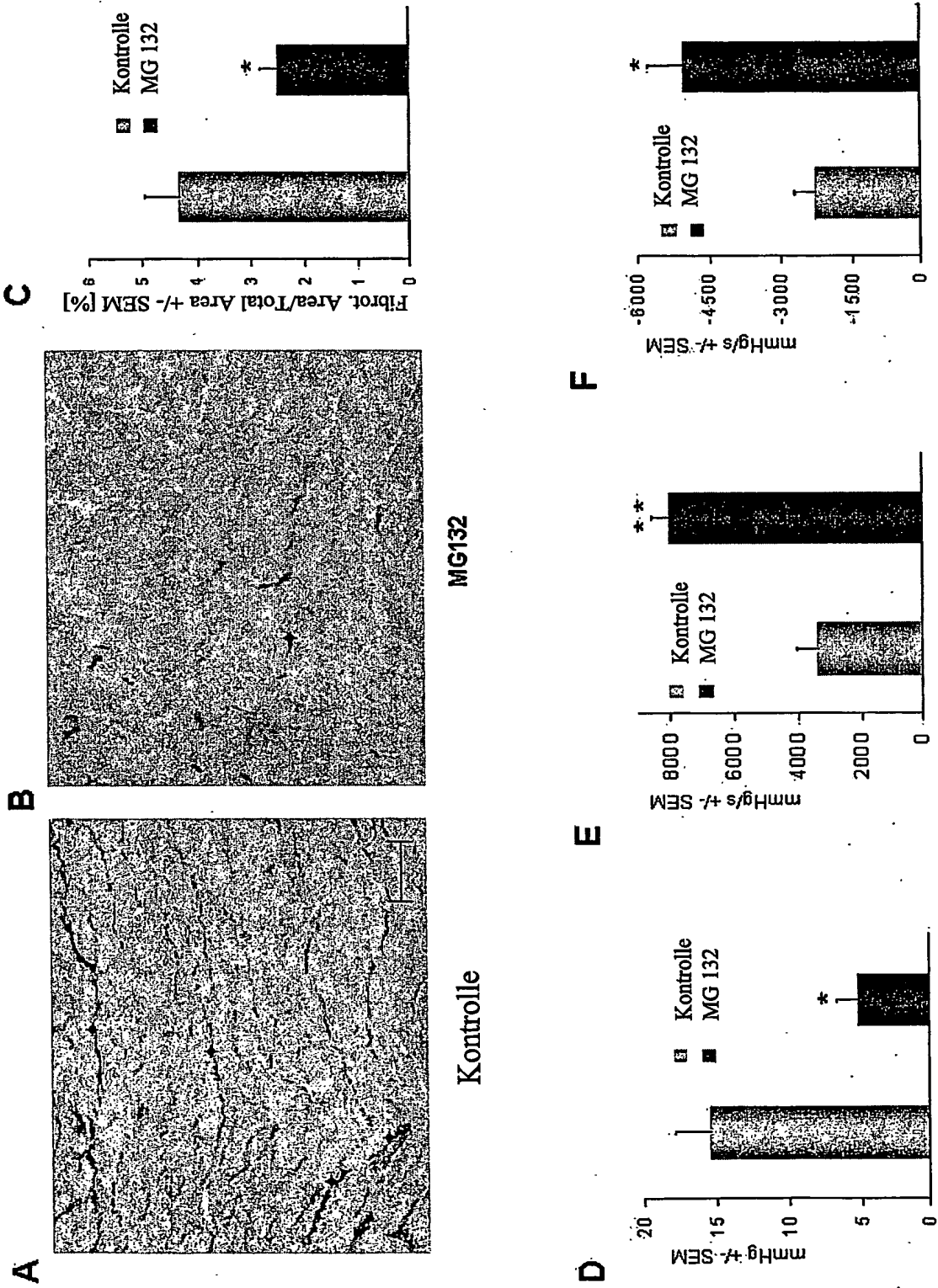


Fig.2

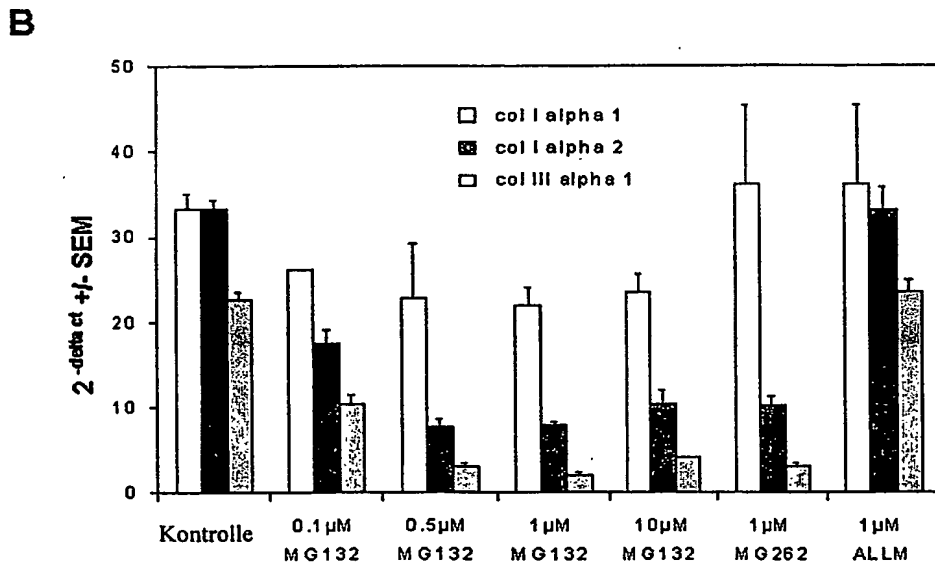
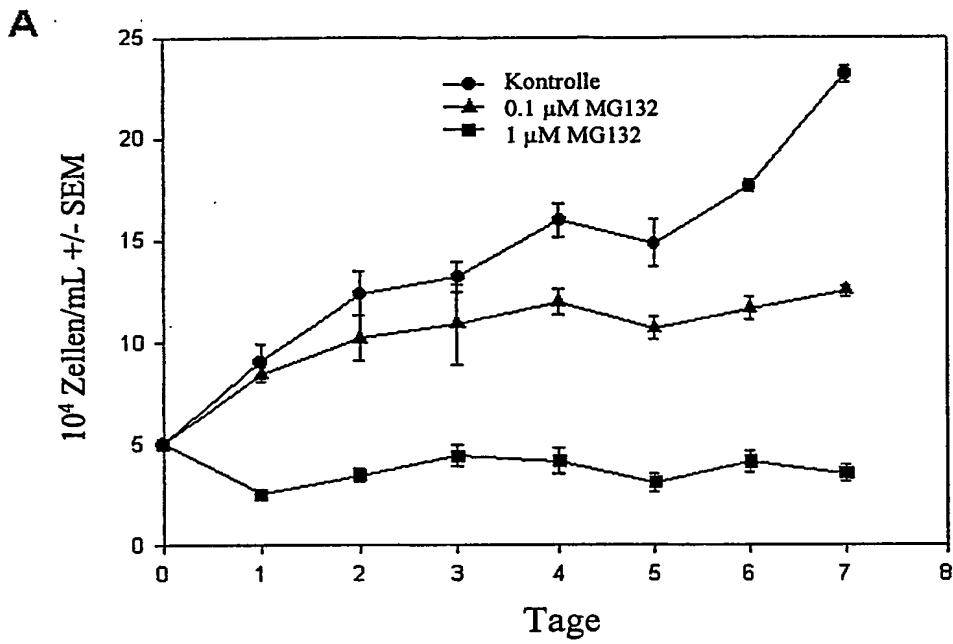
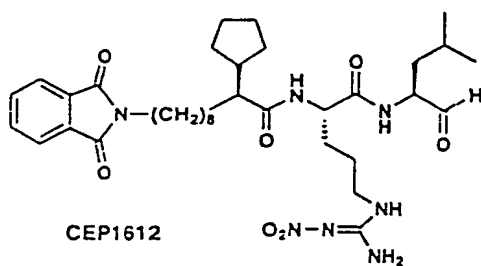
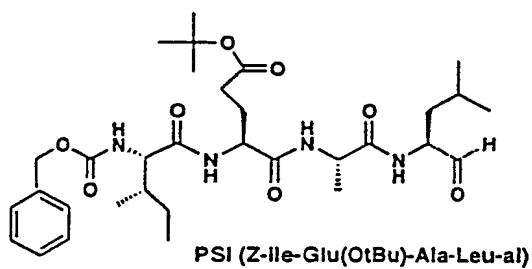
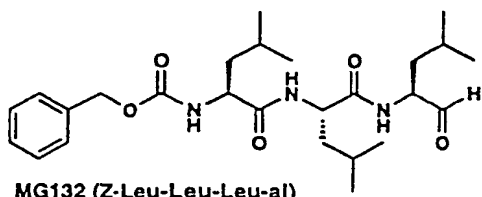
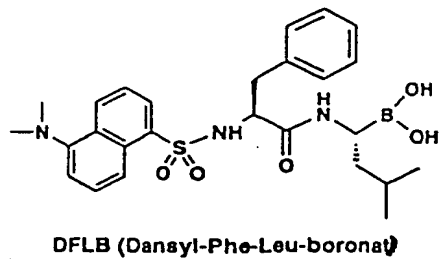
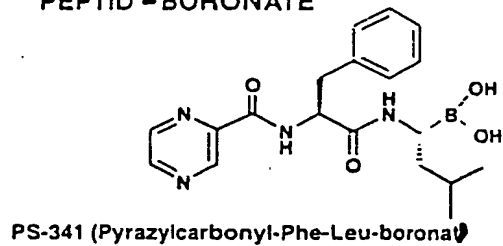


Fig. 3 A

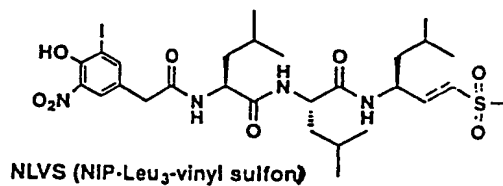
PEPTID-ALDEHYDE



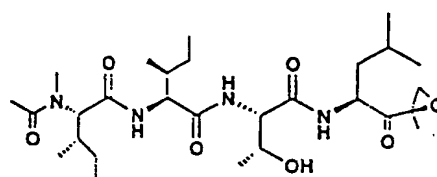
PEPTID-BORONATE



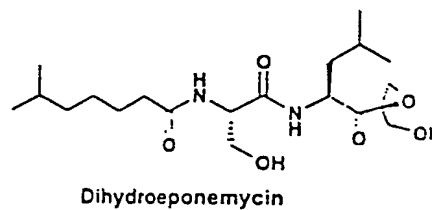
PEPTID-VINYL SULFONE



PEPTID-EPOXYKETONE



Epoxomicin (Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX)



LACTACYSTINE

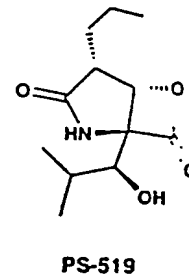
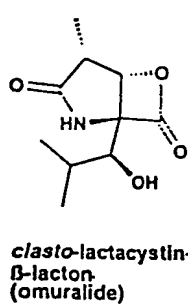
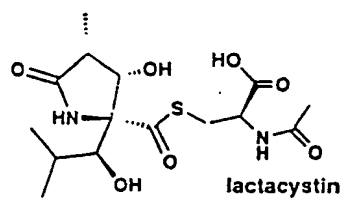
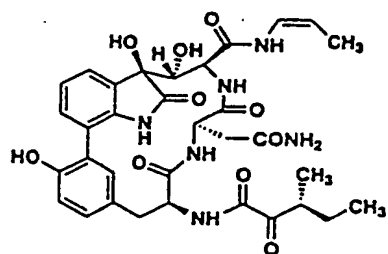
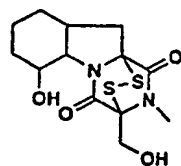


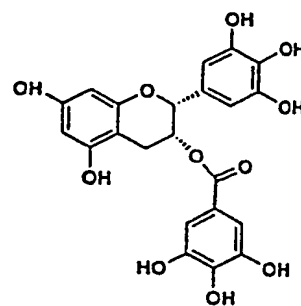
Fig. 3 B



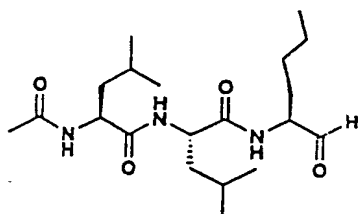
TMC-95A



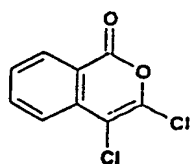
gliotoxin



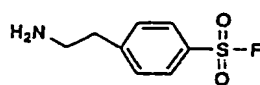
EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate)



ALLN (Ac-Leu-Leu-Nle-al)



3,4-dichloroisocoumarin



4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (Pefablock SC)